Lane Medical Library

Aus der
medizinischen Universitätsklinik zu Frankfurt a. Main
(Direktor: Prof. Dr. G. v. Bergmann)

Die Affinität der Homogentisinsäure zu Zellen und Geweben

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität
Frankfurt a. M.

Vorgelegt von
Günther Lomnitz
aus Limburg a. d. Lahn
im Juli 1926

Aus der
medizinischen Universitätsklinik zu Frankfurt a. Main
(Direktor: Prof. Dr. G. v. Bergmann)

Die Affinität der Homogentisinsäure zu Zellen und Geweben

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität
Frankfurt a. M.

Vorgelegt von
Günther Lomnitz
aus Limburg a. d. Lahn
im Juli 1926

Druck von J. Wartenberg, Frankfurt am Main

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Frankfurt a. M.

Referent: Herr Professor Dr. G. Katsch.

Dekan: Herr Prof. Dr. Strasburger.

Dem Andenken meiner lieben Claire!

Inhaltsangabe.

1. Ergebnisse der Forschungen über Alkaptonurie, Ochronose und Homogentisinsäure.
2. Eigene Untersuchungen.
   a) Technik der Untersuchungen.
   b) Befunde und Ergebnisse der Untersuchungen.
      1. im Blute,
      2. in Gewebschnitten.
   c) Vergleichende Betrachtungen.
3. Zusammenfassung.
4. Literatur.

Im Jahre 1859 entdeckte Boedecker [4] eine Stoffwechselanomalie, die durch das Verhalten des Harns, sich bei Alkalizusatz von der Oberfläche her tief dunkel zu verfärben, charakterisiert ist, und nannte sie deshalb Alkaptonurie.

Einige Jahre später fand Rudolf Virchow [17] bei einer Sektion, daß alle Knorpel bei der Freilegung gefärbt erschienen, teils waren sie tintenschwarz und hellgrau, teils braun und hellbraun, vielfach ockerfarben. Auch knorpelähnliche Bindesubstanzen (Sehnen, Ligamente) sowie die Arterien, insbesondere die Aorta erschienen gefärbt. Machte er feine Schnitte, so stellte sich heraus, daß die schwarze Farbe verschwand und man überall dieselbe braune oder Ockerfarbe sah. Er stelte damit das Bild der Ochronose auf.

Bald nach den ersten Veröffentlichungen Boedecker's und Virchow's wurden mehr Fälle mit ähnlichen Befunden bekannt und dabei war es sehr auffallend, daß man bei Fällen von Ochronose eine Alkaptonurie fand oder umgekehrt bei Alkaptonurikern gleichzeitig eine Ochronose feststellen konnte. Albrecht [2] war der erste, der die Ochronose für eine Begleiterscheinung der Alkaptonurie hielt, und nach ihm konnten Clemens [6], Wagner [18], Allard und Groß [3] bei sicheren Ochronosefällen Alkaptonurie nachweisen, so daß auch sie den Zusammenhang zwischen Alkaptonurie und Ochronose als erwiesen ansahen.

Virchow hielt den für die Ochronose charakterstischen Farbstoff für ein Hämatinderivat, wie es bei Extravasaten häufig gesehen wurde, und in dieser Ansicht wurde er durch die chemischen Untersuchungen Kühne's bestärkt. Auch Heile [8] war der Ansicht, daß das ochronotische Pigment aus dem Blute stamme und die Ochronose eine besondere Art der Hämochromatose sei, bei der die leimgebenden Substanzen, insbesondere die Knorpelzellen durch Oxydation das im Kreislauf zirkulierende Chromogen in Melanin überführe. Er zweifelte aber schon daran, daß man die hochgradigen Pigmentierungen in den von ihm beschriebenen Fällen allein auf die Resorption von den Blutergüssen zurückführen könne.

Die weiteren Forschungen ergaben dann, daß es sich bei der Ochronose und auch bei der Alkaptonurie, als deren charakteristische Substanz von Wolkow & Baumann [19] die Homogentisinsäure aus dem Alkaptonurikerharn dargestellt wurde, um melaninartige Körper handelt. Diese Farbstoffe entstehen aus aromatischen Komplexen unter Einwirkung oxydierender Fermente, wie sie als Tyrosinasen im tierischen und pflanzlichen Organismus allgemein verbreitet vorkommen. Vor allen war es Pick [14], der für den melaninartigen Charakter des Farbstoffes eintrat; zudem konnte er zeigen, daß die Ochronose nicht nur als Begleiterscheinung der Alkaptonurie sondern auch als Folge jahrelanger Carbolzufuhr in den Körper, wie sie durch Behandlung der Unterschenkelgeschwüre mit Carbol gegeben war, entstehen kann. Die Carbolochronose, die Pick im Gegensatz zur „endogenen" Alkaptonochronose als „exogene" Form der Ochronose bezeichnet, macht dieselben Erscheinungen wie die Alkaptonochronose. Bei der endogenen Form der Ochronose wird das Melanin von der Homogentisinsäure, die aus dem Tyrosin und Phenylalanin des zerfallenen Eiweißmoleküls entsteht und von dem Alkaptonuriker nicht verbrannt wird, gebildet. Bei der Carbolochronose ist es das aus dem Phenol entstehende Hydrochinon und Brenzkatechin, das zur Melaninbildung führt, in beiden Fällen also aromatische Körper.

Mit dieser einfachen melaninartigen Dunkelfärbung ist die Alkaptonreaktion jedoch nicht hinreichend geschildert. Gelegentlich wurden auch Rotfärbungen des Alkaptonharnes beobachtet und Moerner [13] stellte die Bedingungen fest, unter denen diese Rotfärbungen, die er Alkaptochromreaktion nannte, auftraten. Homogentisinsäure, Ammoniak und Luftsauerstoff sind die Faktoren, die sowohl zur Alkapton- wie zur Alkaptochromreaktion nötig sind. Bei der Alkaptochromreaktion sollte der Homogentisinsäuregehalt nach Moerner nicht unter ¼% heruntergehen, die Konzentration des Ammoniaks mußte 1—4% betragen, der Luftsauerstoff durfte nur langsam zutreten. Der wesentlichste dieser drei Faktoren war der letzte, die Zufuhr von Luftsauerstoff; derselbe Harn, der in weithalsigen Flaschen Braunfärbung zeigte, wies in solchen mit engem Halse die Alkaptochromreaktion auf. Katsch [11], der die Sauerstoffzufuhr durch Wasserstoffsuperoxyd quantitativ regelte, kam jedoch zu folgenden Ergebnissen, die im Gegensatz zu dem standen, was man nach Moerner's Erfahrungen erwartete. Wenn er nämlich zu gleichen Mengen Alkaptonurikerharnes Wasserstoffsuperoxyd verschiedener Konzentration zusetzte, dann trat die Alkaptochromreaktion nur bei stärkerem Sauerstoffgehalt auf, während der weniger sauerstoffhaltige Alkaptonharn die typische dunkelbraune Farbe hat. Weiter konnte Katsch dadurch, daß er in einem Reihenversuche reiner Homogentisinsäurelösung Wasserstoffsuperoxyd in steigenden Mengen zusetzte, eine ganze Farbenskala von Schwarz, über Schwarzbraun, Braunrot, Rot, Rotgelb zu Gelb aufstellen. Er zeigte ferner, daß es schließlich bei stärkerem Wasserstoffsuperoxydzusatz zu völliger Entfärbung der Lösung kam und dann Homogentisinsäure nicht mehr nachweisbar war.

Gibt es identische Vorgänge im Körper, so müssen die Rolle des Wasserstoffsuperoxydes im Reagenzglase im Körper oxydative Fermente, wie diese, wie wir schon anfangs sahen, zur Farbstoffbildung unbedingt nötig sind, übernehmen. Daß Homogentisinsäure überhaupt durch oxydative Fermente angegriffen werden kann, das konnten Abderhalden & Guggenheim [1] mit der aus Russula delica gewonnenen Tyrosinase zeigen. Ob es aber auch im Körper derartige fermentative Vorgänge gibt, die zur Alkaptonurie und Ochronose führen, diese Frage wurde zunächst von Allard & Groß mit Nein beantwortet. Ihre Ansicht suchten sie durch folgende Experimente zu stützen: Sie legten Knorpelstückchen in schwachsaure Homogentisinsäurelösungen und bemerkten, daß ganz allmählich eine von der Oberfläche sehr langsam in die Tiefe eindringende graue bis ins schwarze übergehende Pigmentierung eintrat, und wegen der Langsamkeit dieses Vorganges lehnten sie eine Fermentwirkung gegenüber einer rein chemischen Avidität ab. Demgegenüber schienen jedoch die Untersuchungen von Katsch zugunsten einer Fermentwirkung zu sprechen. Wenn man Stückchen verschiedenster Organe in eine einprozentige Homogentisinsäurelösung einlegte und in den Brutschrank stellte, so trat bei allen Organen ziemlich schnell eine Grau-, Braun- und Schwarzfärbung ein und daß sich gerade Eiter ganz besonders schnell färbte, machte die Annahme, daß es sich bei diesen seltenen Krankheitsbildern um oxydativ, fermentative Vorgänge handelt noch wahrscheinlicher.

Ich versuchte nun diese Vorgänge durch mikroskopische Untersuchungen genauer zu prüfen. Es schien mir interessant, ob man experimentell im überlebenden Gewebe das Bild der Ochronose erzeugen könne und ob die Affinität der Homogentisinsäure zu verschiedenen Zellen und Geweben verschieden sei.

Ich untersuchte zunächst die Affinität der Homogentisinsäure zu den Blutzellen, im normalen Blut, im Blut eines Alkaptonurikers und dann im Blut bei myeloischer und lymphatischer Leukämie. Daran schlossen sich dann die Versuche an, die Affinität zu verschiedenen Geweben zu prüfen. Es lag nahe, die von der Ochronose meist befallenen Gewebe, Knorpel und Gefäße, dann andere Gewebe, ich verwandte hauptsächlich Leber und Niere, zu den Versuchen heranzuziehen.

Zunächst sei Einiges zur Technik gesagt, die sich etwa folgendermaßen gestaltete:

Die zu den Versuchen verwandte Homogentisinsäure wurde nach dem Verfahren von Wolkow und Baumann ([16]) aus dem Harn eines Alkaptonurikers gewonnen (Schmelzpunkt 146°). Zu allen Versuchen wurde eine einprozentige in physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Lösung benutzt.

Die lufttrockenen Blutausstriche werden ohne vorherige Fixation in Standgläsern, die mit der einprozentigen Homogentisinsäurelösung beschickt sind, gestellt, vor Verdunstung geschützt und immer sowohl bei Zimmertemperatur wie auch im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Es werden stets ganze Serien von Blutausstrichen hergestellt und jedes Mal zur selben Zeit ein Präparat aus dem Ständer bei Zimmertemperatur und eines aus dem im Brutschranke entnommen, sehr gründlich mit Wasser abgespült und ohne jegliche Nachfärbung mit der Oelimmersion betrachtet. Die Präparate werden über Minuten, Stunden, Tage und Wochen beobachtet. In ähnlicher Weise werden die Gewebschnitte behandelt; die möglichst lebensfrischen Gewebsstückchen werden nicht fixiert, sondern nach Agareineinbettung geschnitten. Die Agarlösung wird so hergestellt, daß pulverisierter Agar durch Kochen im Wasser 2%ig gelöst wird. Die Gewebstückchen werden in die abgekühlte Lösung gelegt und nach Erstarren des Agars samt der umgebenden Agarschicht ausgeschnitten, mit Hilfe eines nassen Filtrierpapiers auf dem Mikrotom angefroren und geschnitten. Die möglichst dünnen Gefrierschnitte werden in Schälchen mit der 1%igen Homogentisinsäurelösung übergossen, gleichfalls vor Verdunstung geschützt und sowohl bei Zimmertemperatur wie bei Brutschranktemperatur beobachtet. Die Schnitte werden nach der Entnahme aus der Lösung sorgfältig abgespült und in einer 55%igen Rohrzuckerlösung eingeschlossen und so betrachtet.

Betrachtet man einen Blutausstrich kurz nach dem Einstellen in das Standglas, etwa nach 15 Minuten, so sieht man, daß in dem in der Homogentisinsäurelösung stehenden Teile der Blutfarbstoff ausgelaugt ist und man kann mikroskopisch keine Unterschiede erkennen. Die ersten deutlichen Unterschiede treten nach 48—60 Stunden auf und schon bei schwacher Vergrößerung sieht man tiefdunkle Punkte im sonst ungefärbten Präparat. Mit der Oelimmersion kann man folgendes erkennen: Sowohl die Zellen der myeloischen wie die der lymphatischen Reihe sind dunkel gefärbt. Ferner zeigen die Blutplättchen eine starke Dunkelfärbung und nur die Erythrocyten erscheinen vollkommen ungefärbt oder in etwa 3 Wochen alten Präparaten als blaßgelbliche Scheibchen. Je näher die Zellen der Oberfläche der Homogentisinsäurelösung liegen, um so intensiver erscheint ihre Färbung; am stärksten ist die Reaktion an der Grenze, hier zeigen die Erythrocyten nie eine Tinktion, während die übrigen Zellen tiefschwarz erscheinen. Die stärkste Reaktion zeigen die Kerne der polynukleären Leukozyten, diese erscheinen von dem Protoplasma scharf abgegrenzt, das selbst nur durch feinste Körnchen diffus gefärbt erscheint. Die Granula sind meist heller wie der Kern aber dunkler als das Protoplasma gefärbt. Auch bei den Lymphozyten ist der Kern stets dunkler gefärbt als das Protoplasma, nie erscheint er jedoch so intensiv gefärbt, wie der der granulierten Leukozyten. Dasselbe gilt für alle pathologischen Formen, wie sie bei der myeloischen und lymphatischen Leukämie vorkommen; oft sieht man, daß besonders bei den neutrophilen und eosinophilen Myelocyten die Granula intensiver gefärbt sind als der Kern.

Bei den Untersuchungen des Blutes bei lympathischer Leukämie sah man in den kleinen Lymphocyten und nur in diesen immer excentrisch im Protoplasma eine, selten zwei kleine Vakuolen. In manchen von diesen Präparaten, die nun in Homogentisinsäure standen, erschienen alle diese Vakuolen tiefdunkel gefärbt oder in anderen wieder erschienen alle vollkommen frei.

Diese Präparate standen in denselben Standgläsern und wurden zur selben Zeit herausgenommen. Daß einmal die Vakuolen gefärbt, ein ander Mal ungefärbt erscheinen, wird wohl durch Spannungsunterschiede resp. verschiedene H-Ionenkonzentrationen bedingt sein. — Die Intensität der Reaktion hängt natürlich von den verschiedensten Faktoren ab. Es herrscht hier eine Proportionalität zwischen Zeitdauer, Temperatur und Sauerstoffzufuhr einerseits und Intensität der Reaktion andererseits. Je länger, je näher der optimalen Temperatur und je sauerstoffreicher die Präparate in der Homogentisinsäurelösung gehalten werden, umso intensiver ist die Reaktion.

Das Blut des Alkaptonurikers unterscheidet sich durch nichts von dem des normalen Menschen.

Zur Untersuchung, ob es sich bei den oben geschilderten Befunden um rein chemisch physikalische Vorgänge handelt, oder ob es Fermentwirkungen sind, die zu diesen Resultaten führten, schlug ich zwei Wege ein. Einmal versuchte ich, das Ferment durch Hitze abzutöten, dann stellte ich Parallelversuche mit der von Bloch & Ryhiner (5) beschriebenen Dopaoxydasereaktion an. Dabei verwandte ich folgende Technik: Die Blutausstriche wurden, nachdem sie lufttrocken waren, etwa eine Stunde lang auf 70—190° erhitzt und nachdem sie abgekühlt waren, wurden sie dann in die Homogentisinsäurelösung eingestellt. Dabei zeigte sich zunächst, daß jetzt der Blutfarbstoff nicht mehr ausgelaugt wurde und daß die Temperaturunterschiede keinen wesentlichen Einfluß auf den Ausgang der Reaktion hatten. Da die untere Grenze zwischen 60 und 85° lag, wurden die meisten Präparate nur bis auf 85° erhitzt.

Schon bei schwacher Vergrößerung erkennt man den Unterschied zwischen erhitztem und nicht erhitztem Präparat. Es fehlen vollkommen die dunklen Punkte, das Präparat erscheint gleichmäßig gefärbt. Bei der Betrachtung mit der Oelimmersion sieht man jedoch, daß alle die Zellen, die vorher intensiv gefärbt erschienen, vollkommen farblos sind, ja die Erythrocyten erscheinen mehr tingiert. Man kann die Kerne der Zellen als unregelmäßig gelappte, helle Stellen erkennen. Bei den sehr stark erhitzten Präparaten sieht man häufig kleine dunkle Körnchen, die jedoch keinerlei Struktur erkennen lassen und difus im Protoplasma liegen.

Die vergleichenden Untersuchungen mit Dopa zeigten überraschende, in mancher Beziehung mit den Homogentisinsäurepräparaten parallel gehende Ergebnisse. Die Präparate wurden nach den Angaben von Bloch & Ryhiner in eine 2 ‰ige Lösung von Dopa in physiologischer Kochsalzlösung eingestellt und immer nach vollendeter Reaktion, ohne nachgefärbt zu werden, betrachtet. Die Bloch'schen Befunde konnten meist bestätigt werden, doch sahen wir häufiger als nach den Angaben von Bloch zu erwarten war, polynukleäre Leukocyten, die eine deutliche Kernfärbung zeigten und faßten diese als von Bloch beschriebene X-Zellen auf. Die Präparate der lymphatischen Leukämie zeigten jedoch unzweideutig, daß die Lymphocyten stark auf Dopa reagierten. In vielen Präparaten erschienen alle Lymphocyten tiefdunkel gefärbt und das steht im Gegensatz zu den Befunden, die Block & Ryhier erhoben haben: „Stets negativ ist die Reaktion in den Lymphocyten". Die Kontrollversuche mit der Indophenolblausynthese waren negativ. Auch bei den Versuchen mit den erhitzten Präparaten zeigten sich gleichfalls parallele Vorgänge, wie bei der Homogentisinsäure, mit dem Unterschied, daß bei den mit Dopa gefärbten Präparaten, die Erythrocyten sehr viel dunkler gefärbt waren. Schon makroskopisch fallen diese Präparate durch ihre tiefschwarze Farbe auf.

Als Nächstliegendes zur Erklärung der geschilderten Befunde erscheint mir nach den heutigen Anschauungen der biochemischen Forschungen die Annahme eines Fermentes. Solange wir jedoch die Natur eines Fermentes nicht kennen, und es ist bis heute trotz aller darauf gerichteten Bestrebungen noch nie gelungen, ein solches in reiner Form darzustellen, müssen wir uns mit

einigen mehr oder weniger sicheren Beweisen für die Existenz eines Fermentes begnügen. In unserem Falle spricht für die Fermentwirkung, daß nach dem Erhitzen der Präparate alle die Zellen, die vorher tief dunkel gefärbt waren, keinerlei Tinktion mehr zeigen: Die Fähigkeit der Zellen, Homogentisinsäure zu Alkaptomelanin zu oxydieren ist also thermolabil. Daß alle Zellen sehr viel stärker reagieren, wenn ihnen mehr Sauerstoff zugeführt wird, daß die Reaktion im Brutschrank schneller abläuft als bei Zimmertemperatur, auch das spricht für einen fermentativen Prozeß.

Daß diese Vorgänge sehr lange bis zur vollendeten Reaktion spielen (2 bis 3 Wochen) erscheint mir kein Gegenbeweis für die Annahme eines Fermentes. Daß reiner Eiter, wie Katsch zeigte, besonders schnell eine Dunkelfärbung annimmt, ist nur durch die große Menge des vorhandenen Fermentes zu erklären und stützt somit die Annahme des fermentativen Vorganges. — Ob es sich auch im Körper bei der Alkaptomelaminbildung um fermentative Vorgänge handelt, diese Frage erscheint sehr viel komplizierter, zumal einzelne Gewebe eine besondere Affinität zur Homogentisinsäure zu haben scheinen.

Schon das Bild der Ochronose scheint ein Beweis für die besondere Affinität der Homogentisinsäure zu einem Körpergewebe, dem Knorpel zu sein. Virchow zeigte aber schon, daß auch andere, insbesondere sehnige Gewebe gefärbt waren. Später konnte Katsch zeigen, daß die Affinität des Knorpels zur Homogentisinsäure anscheinend anderen Geweben gegenüber nur relativ gesteigert ist.

Ich versuchte nun diese Vorgänge an den von der Ochronose meist befallenen Geweben, dem Knorpel und den Gefäßen und dann an anderen bei der Ochronose sehr selten befallenen Geweben, der Leber und der Niere, nachzuprüfen.

Zu den Untersuchungen über die Affinität der Homogentisinsäure zum Knorpel verwandte ich Gelenk- und Rippenknorpel und Knorpel der großen Bronchien. Den Gelenk- und Rippenknorpel versuchte ich immer so zu schneiden, daß ich außer dem Knorpel einen kleinen Knochenstreifen mitfassen konnte, der bei dem Gelenkknorpel an der Außenseite, bei dem Rippenknorpel in der Mitte lag. Knorpelschnitte färbten sich gegenüber anderen Geweben nicht stärker. Vergleicht man z. B. Knorpelschnitte mit Schnitten von Aorta, die gleich lang in Homogentisinsäure gelegen haben, so ist kein Farbenunterschied zu erkennen. Davon unterscheiden sich ganz wesentlich die Schnitte, bei denen Knochensubstanz mitgetroffen ist. Schon makroskopisch fällt auf, daß der Knochen gegenüber dem braunen Knorpel tiefschwarz gefärbt erscheint. Aber auch im Knorpel sind Unterschiede der Färbung vorhanden: je näher das Knorpelgewebe an dem Knochengewebe liegt, um so intensiver ist es gefärbt. Die Farbe der Knorpelsubstanz nimmt an Tiefe zu, je näher diese der Knochensubstanz liegt. Die Intensität der Färbung steigert sich jedoch nicht so, daß allmählich die Farbe der Knorpelsubstanz in die der Knochensubstanz übergeht, sondern der Knorpel erscheint tiefdunkelbraun, der Knochen dagegen tiefschwarz. Die Unterschiede sind sehr viel drastischer in Präparaten, die nur ganz kurze Zeit in der Homogentisinsäure gelegen haben (48 Stunden); erscheint in diesen der Knorpel noch blaßgelb, so ist der Knochen schon tiefdunkelbraun gefärbt. Bei den Präparaten von Rippenknorpel treffen wir die gleichen Bilder an; es zeigt sich, daß die Randpartien, das Perichondrium und das darunter gelegene Knorpelgewebe sehr viel heller erscheint als das nach der Mitte dem Knochen am nächsten liegende Gewebe. Das Perichondrium erscheint als schmaler, dunklerer Saum als das ihm am nächsten liegende Gewebe. In der Knorpelsubstanz nimmt dann die Färbung zu, je näher das Gewebe dem Knochen liegt. Diese Unterschiede sind sehr viel deutlicher bei der mikroskopischen Betrachtung.

Bei schwacher Vergrößerung erkennt man schon, daß die elastischen Fasern des Perichondriums dunkler gefärbt sind, als das Bindegewebe und dadurch erscheint das Perichondrium etwas dunkler gefärbt als das ihm am nächsten liegende Knorpelgewebe.

In dem Knorpelgewebe selbst erscheinen die Knorpelzellen als tiefdunkelbraune Flecken, meist von der Kapsel retrahiert. Die Knorpelkapseln selbst erscheinen als tiefdunkel gefärbte mehr oder weniger breite Streifen. Die Knorpelkapseln werden von den diffus gelblich gefärbten Territorien umgeben und diese Territorien werden durch die dunkler als sie selbst gefärbte interterritoriale Substanz zu der gleichartig braungefärbten Grundsubstanz verbunden.

Betrachten wir die Präparate mit der Oelimmersion, so sind noch feinere Unterschiede in den Knorpelzellen selbst zu erkennen; in diesen färbt sich der Kern intensiver als das Protoplasma.

Bei vielen Präparaten des Gelenkknorpels erkennt man eine wellige, verdoppelte, tiefdunkel gefärbte Linie, die an der Grenze zwischen Knorpel und Knochen liegt. Es scheint sich hier wohl um die von Ishido [10] beschriebene „Grenzlinie" zu handeln.

Vergleicht man die oben geschilderten Befunde, mit denen bei der Ochronose von Virchow und später von Heile erhobenen, so unterscheiden sich diese experimentell hergestellten Präparate in nichts von denen im Organismus durch die Krankheit entstandenen. Virchow schreibt: „Schnitt man in die Gelenkfläche tiefer ein, so wurde die Farbe um so mehr gesättigter je mehr man sich dem Knochen näherte". Auch Heile schreibt: „Sämtliche Zwischenwirbelscheiben sind grauschwärzlich gefärbt und zwar auf dem Durchschnitt immer die dem Knochen am nächsten liegenden Teile am dunkelsten". Die mikroskopischen Befunde Heile's decken sich mit den von mir geschilderten nicht immer ganz und dies scheint auch sehr erklärlich, da es sich bei den von Heile beschriebenen Befunden meist um regressive Veränderungen im Knorpel handelt, während ich gesunden Knorpel zu den Exeperimenten verwandte.

Merkwürdig erscheint nur, daß eine Färbung der Knochensubstanz bisher nirgendswo beschrieben wird, die doch in allen von mir hergestellten Präparaten am intensivsten erscheint.

Die Erklärung dafür, daß die dem Knochen am nächsten liegende Knorpelsubstanz sich stärker färbt, als die von ihr weiter entfernte, gibt Virchow darin, daß hier die Ernährung eine bessere ist, weil hier die vasa nutritia des Knochens enden. Gleichzeitig ist dies aber auch ein Beweis dafür, daß es sich um einen oxydativen Prozeß handelt, denn in dem sauerstoffhaltigeren Teil des Knorpelgewebes ist die Oxydationsfähigkeit sicher größer als in den mit weniger Sauerstoff versorgten Teilen.

In den Fällen von Ochronose erschienen außer den Knorpeln auch die großen Gefäße stets gefärbt. Vergleicht man nun auch hier die Befunde der ochronotischen Gefäße mit den von mir experimentell hergestellten Präparaten aus Aorta, so finden wir auch hier eine vollkommene Uebereinstimmung.

Schon makroskopisch lassen sich Einzelheiten unterscheiden. Der der Intima entsprechende Teil ist durch einen feinen gelblich braunen Saum von den tiefdunkelbraunen sehr viel breiterem Bande der Media deutlich zu unterscheiden. Die Externa ist wieder sehr viel heller und in ihr selbst erkennt man einzelne kleine Gefäße, die wie von einem dunkelbraunen Saum umgeben zu sein scheinen.

Bei mikroskopischer Betrachtung erscheinen die Endothelzellen ebenso die dicht darunter liegenden streifigen Bindesubstanzen hellgelblich; die elastischen Fasern der Bindesubstanz heben sich durch ihre dunklere Farbe etwas

ab und diese ist intensiver, je näher sie der Tunica media liegen. In der Tunica media selbst, welche durch die die muskulären Elemente an Menge übertreffende elastischen Elemente charakterisiert ist, erscheinen die elastischen Fasern sehr viel intensiver gefärbt als die muskulären Elemente. Die Externa zeigt die feinfaserigen Bindegewebe weniger gefärbt als die feinen elastischen Fasern. Die schon bei der makroskopischen Betrachtung auffallenden kleinen Gefäße, die wie von einem kleinen dunkelbraunen Saum umgeben erschienen, lassen sich als kleine Arterien indentifizieren und der Saum selbst ist die tief dunkel gefärbte Media. Daß die Intima in dem der Media am nächsten liegenden Teile am stärksten gefärbt ist, sucht Virchow dadurch zu erklären, daß diese Teile an die gefäßhaltige Media grenzen.

Zur Entscheidung der Frage, ob die bei der Ochronose befallenen Gewebe wegen ihrer größeren Affinität zur Homogentisinsäure gefärbt erscheinen, stellte ich dann die gleichen Versuche mit Nieren- und Lebergewebe an. Daß Nierengewebe bei der endogenen Ochronose pigmentiert sein kann, zeigten schon Poulsen [13] und Kleinschmidt [12]. Auch hier finden wir mit den experimentellen Präparaten übereinstimmende Ergebnisse.

Die Rindensubstanz der Niere erscheint makroskopisch dunkler gefärbt als die Marksubstanz. In der Rindensubstanz erkennt man die Glomeruli als kleine intensiv dunkel gefärbte Punkte; ebenso erscheinen in den Nierenpräparaten die Arterien als tief gefärbte Streifen, resp. Ringe.

Bei mikroskopischer Betrachtung erscheint die Nierenkapsel als heller Saum, deren elastische Bindegewebfasern sich von der Bindesubstanz stärker tingiert abheben. Die Glomeruli sind dunkelbraun gefärbt und werden von den stärker tingierten als haarscharfe Linien imponierenden Bowmann'schen Kapseln umgeben. Die Tubuli contorti erscheinen meist noch dunkler gefärbt als die Glomeruli, während die Tubuli recti zwar deutlich stärker tingiert erscheinen als das hellgelbliche interstitielle Gewebe, aber deutlich blasser sind als das übrige Gewebe.

Auch das Lebergewebe kann, wie Heile zeigte, bei der Ochronose einmal befallen sein.

Das Bindegewebe der Glisson'schen Kapsel erscheint als heller Saum um das sehr viel intensiver gefärbte Lebergewebe gelegt. Die Läppchenzeichnung ist nicht deutlich, jedoch erkennt man in vielen Läppchen gerade die zentral gelegenen Zellen stärker tingiert als die weiter peripher liegenden. Besonders intensiv gefärbt sind die Kupfer'schen Sternzellen.

Vergleichen wir nun die Präparate von Knorpel, Aorta, Niere und Leber untereinander, so finden wir, daß mit Ausnahme des Knochengewebes in der Intensität der Färbung kaum Unterschiede bestehen. Ueberall sehen wir die gleichmäßig braune Farbe und selbst das makroskopisch tiefschwarz aussehende Knochengewebe erscheint bei mikroskopischer Betrachtung tief dunkelbraun gefärbt.

Wir sehen also nicht nur in den von der Ochronose befallenen Geweben die typische Alkaptomelaninbildung, sondern auch andere Gewebe ergeben im Experimente unter gleichen Bedingungen die gleichen Färbungen. Damit ist wohl der Beweis erbracht, daß der Knorpel keine größere Affinität zur Homogentisinsäure besitzt, als die anderen Gewebe, ja in Experimente muß man den Knochen die stärkste Affinität zur Homogentisinsäure zusprechen.

Daß wir experimentell das Bild der Ochronose am überlebenden Knorpel mit natürlicher Treue nachahmen können, das erscheint uns eher verständlich zu sein als die Erklärung dafür geben zu können, wieso beim Lebenden nicht alle Gewebe in gleicher Weise reagieren wie im Experimente.

Daß es sich bei diesen Prozessen um fermentative Vorgänge handelt, dafür scheint mir ein Beweis, daß die Präparate bei Zimmertemperatur eine schwächere Reaktion zeigen als die im Brutschrank bei Körpertemperatur stehenden. Daß das sauerstoffhaltigere Gewebe stärker gefärbt ist als das sauerstoffärmere, das kann sowohl für einen fermentativen als auch für einen chemischen Prozeß sprechen.

Die Tatsache, daß bei der Ochronose unter den Geweben gerade der Knorpel und die sehnigen Gewebe, besonders lebhaft die Fähigkeit haben, Melanin zu bilden, spricht gegen einen rein fermentativen Vorgang.

Die Hypothese Katsch's: „Es könne eine mangelnde Oxydationsfähigkeit gerade in den gefäßlosen, mit Sauerstoff schlecht gespeisten Knorpeln zu einer Ansammlung des Melanins führen" erscheint durch die geschilderten Befunde unwahrscheinlich; denn gerade das sauerstoffreichere Knorpelgewebe zeigt sowohl bei der Ochronose wie im Experimente eine stärkere Dunkelfärbung.

Fischberg (7) sucht die gesättigte Pigmentierung des Knorpels in der Nähe der gefäßführenden Teile eben durch die Nähe des Gefäßapparates und die damit im Zusammenhang stehende Ablagerung der Pigmentbildner zu begründen. Diese Gründe erscheinen nunmehr nicht mehr stichhaltig, denn auch im Experimente ist die Pigmentierung des dem gefäßführenden Apparate am nächsten liegenden Gewebes am stärksten. Es scheint sich eben nur um die Sauerstoffwirkung zu handeln, wie sie ja gerade bei den Blutpräparaten am besten gezeigt werden konnten; je tiefer nämlich das Präparat in der Homogentisinsäurelösung stand, um so schwächer war die Pigmentierung, am gesättigsten war sie an der Oberfläche der Lösung. Ebenso konnte ich bei den Nierenpräparaten zeigen, daß die gefäßreichere, stärker durchblutete Rindensubstanz intensiver gefärbt war als die Marksubstanz.

Ob man überhaupt im überlebenden Gewebe noch von sauerstoffreicheren oder sauerstoffärmeren Teilen sprechen kann, dafür sind sichere Beweise nicht zu erbringen. Man könnte jedoch die Vorgänge bei dem Alkaptonurikerharn, der sich nur bei Sauerstoffzutritt von der Oberfläche her allmählich weiter in die Tiefe eindringend tiefdunkel färbt und zwar so, daß die der Oberfläche zunächst stehende Schicht am dunkelsten und die tiefer liegende heller erscheint, als Modellversuch zur Stützung der angenommenen Hypothese betrachten. Als weiterer Modellversuch könnte die schon oben geschilderten Befunde bei den Blutpräparaten dienen und außerdem die Tatsache, daß ohne Sauerstoff nie eine Alkaptomelaninbildung zustandekommt.

Von der bleichenden Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds auf das Alkaptomelanin konnte ich mich durch Versuche, bei denen ich die gefärbten Gewebschnitte in einer 10%igen Wasserstoffsuperoxydlösung längere Zeit liegen ließ, überzeugen. Diese oxydierende Wirkung gilt für alle Melanine und ich glaube nicht, daß wir damit das Problem der örtlichen Veranlagung der Ochronose lösen können. Als weiterer Beweis dafür gilt mir die Ochronose der Tiere.

Die Ochronose der Tiere befällt im Gegensatz zu der des Menschen nie die Knorpel, sondern die Pigmentablagerungen finden sich lediglich im Knochen. Der Anschauung, daß dieses Pigment dem Blutfarbstoff entstamme tritt Ingier (9) entgegen und nimmt einen Zusammenhang zwischen Chlorophyll und diesem Pigment an. Pincussohn (10) lehnt einen Zusammenhang dieser Pigmentbildung mit der menschlichen Ochronose ab. Im Experimente konnte ich jedoch zeigen, daß von allen Geweben am intensivsten der Knochen gefärbt war. Es scheint mithin, als ob auch im tierischen Organismus dieselbe alkaptonurische Stoffwechselstörung nur in anderer Form auftritt.

Damit entsteht ein neuer Begriff, der bisher noch unbekannten Affinität der Homogentisinsäure zum Knochengewebe, die man als Osteotropie der Homogentisinsäure bezeichnen könnte. Gleichzeitig damit liegt jetzt die Frage

nahe, warum im menschlichen Organismus nie der Knochen und im tierischen nie der Knorpel befallen wird, wenn vielleicht die gleiche Stoffwechselstörung vorzuliegen scheint, deren charakteristische Substanz die Homogentisinsäure sowohl den Knorpel als auch den Knochen färbt.

So gestaltet sich das Bild der alkaptonurischen Stoffwechselstörung und der mit ihr verwandten Ochronose immer komplizierter. Es ist unmöglich, einzelne Vorgänge, seien sie chemischer oder physikalischer Art, allein zur Beweisführung der jeweiligen Befunde ins Feld zu führen. Nur durch die Summation aller vitalen Vorgänge lassen sich die einzelnen Befunde erklären.

Die Homogentisinsäure wird unter den verschiedensten Bedingungen zum Alkaptomelanin umgewandelt: es spielen dabei physikalisch chemische, kolliodale, fermentative Vorgänge eine Rolle, die eng miteinander verkettet im Organismus zu den bekannten Bildern führen.

Wir fühlen einen inneren Zusammenhang, ohne ihn zu begreifen, oder gar ergründen zu können.

Zusammenfassung.

Die Affinität der Homogentisinsäure zu Zellen und Geweben scheint im Organismus eine elektive zu sein, da nur einzelne Gewebe bei der Ochronose durch das aus der Homogentisinsäure entstehende Alkoptomelanin gefärbt sind. Die experimentellen Untersuchungen im überlebenden Gewebe und im Blute ergeben jedoch, daß die Affinität der Homogentisinsäure in einzelnen Geweben nur relativ gesteigert ist.

Im Experimente können die Bilder der Ochronose naturgetreu reproduziert werden.

Daß der Knochen im Experimente am stärksten von allen Geweben aus der Homogentisinsäure das Alkaptomelanin bildet, ist nie bei der Ochronose des Menschen beobachtet und deshalb wird der neue Begriff der Osteotropie der Homogentisinsäure eingeführt. Die osteotropische Wirkung der Homogentisinsäure gewinnt an Bedeutung, wenn man die Ochronose der Tiere, die ausschließlich die Knochen befällt, als eine der alkaptonurischen Stoffwechselstörung bei Menschen ähnliche Erkrankung auffassen kann.

Die örtliche Veranlagung der Ochronose kann nur durch das Zusammenwirken verschiedenster, eng miteinander verbundener vitaler Vorgänge erklärt werden, von denen uns jetzt zu wenige bekannt sind, um sichere Schlüsse daraus zu ziehen.

Als meine angenehme Pflicht betrachte ich es, meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Katsch, für die Anregung zu dieser Arbeit, für die Ueberlassung der zu den Versuchen nötigen Homogentisinsäure, sowie für die liebenswürdige Uebernahme des Referates meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Günther Lomnitz, bin am 29. November 1901 zu Limburg/Lahn geboren. Nachdem ich am 3. März 1920 am Gymnasium zu Limburg die Reifeprüfung abgelegt hatte, widmete ich mich dem Studium der Medizin und habe in Marburg, Frankfurt a. M. und Berlin studiert.

Am 16. Mai 1923 bestand ich in Frankfurt a. M. die ärztliche Vorprüfung und am 4. Mai 1925 dortselbst die ärztliche Prüfung.

Während meines praktischen Jahres arbeitete ich an der Medizinischen Universitätsklinik zu Frankfurt a. M., an der ich jetzt noch als Volontärassistent tätig bin.

Literatur

1. Abderhalden, E. und Guggenheim, M. Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus Russula delica.
   Zeitschr. f. physiol. Chem. 54. 1908 S. 331
   57. 1908 S. 329
2. Albrecht, H. Ueber Ochronose.
   Zeitschr. f. Heilk. 23 1902 S. 366, 379
3. Allard, E. und Gross. Alkaptonurie und Ochronose.
   Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Med. und Chir. 19 1908 S. 24
4. Boedeker. Ueber das Alkapton, ein neuer Beitrag zur Frage: Welche Stoffe des Harns können Kupferreduktion bewirken?
   Zeitschr. f. ration. Med. 3R 7 1859 S. 130
5. Bloch, Br. und Ryhiner, P. Histochemische Studien in überlebendem Gewebe über fermentative Oxydation und Pigmentbildung.
   Zeitschr. f. d. ges. experim. Med. 5 1917 S. 179
6. Clemens. Diskussion zu dem Vortrag von Blum (Straßburg). Versuche über Alkaptonurie.
   24. Kongr. f. i. Med. 1907 S. 249
7. Fishberg, E. H. Ueber die Carbolochronose.
   Virchows Archiv 251 1924 S. 376
8. Heile. Ueber die Ochronose und die durch Formol verursachte pseudo-ochronotische Färbung der Knorpel.
   Virchow's Archiv 160 1900 S. 148
9. Ingier, A. Ueber Ochronose bei Tieren.
   Ziegler's Beitr. z. phatol. Anat. 51 1911 S. 199
10. Ishido, B. Gelenkuntersuchungen.
    Virchow's Archiv 244 1923 S. 424
11. Katsch, G. Homogentisinsäure als Chromogen.
    Münch. Med. Woch. 1918 Nr. 44 S. 1180
12. Kleinschmidt, Werner. Ueber einen Fall von endogener Ochronose bei Alkaptonurie.
    Frankf. Zeitschr. f. Pathol. 28 1922 S. 73
13. Moerner, C. Th. Zur Chemie d. Alkaptonharns.
    Zeitschr. f. physiol. Chem. 69 1911 S. 329
14. Pick, L. Ueber die Ochronose.
    Berl. klin. Wochenschr. 1906 Nr. 16 S. 478
    Nr. 17 S. 508
    Nr. 18 S. 556
    Nr. 19 S. 591
15. Poulsen, V. Ueber Ochronose bei Menschen und Tieren.
    Ziegler's Beitr. z. phatol. Anat. 48 1910 S. 346
    S. 437
16. Pincussohn, L. Alkaptonurie.
    Ergebn. d. inn. Med. und Kinderheilk. 8 1912 S. 454
17. Virchow, R. Ein Fall von allgemeiner Ochronose der Knorpel und knorpelähnlichen Teile.
    Virchow's Arch. 37 1866 S. 212
18. Wagner, A. Ueber Ochronose.
    Zeitschr. f. klin. Med. 65 1908 S. 119
19. Wolkow, M. und Baumann, E. Ueber das Wesen der Alkaptonurie.
    Zeitschr. f. physiol. Chem. 15 1891 S. 228.